昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, May 2017, 60(5): 505 – 512 doi: 10.16380/j.kcxb.2017.05.002

短时热激后家蚕对核型多角体病毒的抗性及相关抗菌肽和热激蛋白基因表达水平的变化

唐芬芬[1,2], 郑亚强[1], 白兴荣[2,*], 陈 斌[1,*]

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;
2. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101)

摘要:【目的】探讨短时热激对家蚕 *Bombyx mori* 抵抗核型多角体病毒能力的影响,为深入研究家蚕热激响应的抗病毒免疫机制提供参考。【方法】家蚕 5 龄幼虫 42℃ 热激 15 min 后,经口喂食家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)(5.4×10^6 PIBs/头)后正常饲养,观察热激对家蚕感染病毒的影响;同时,利用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测热激后 7 类抗菌肽主基因(*BmcecD*, *Bmmor*, *Bmglve*2, *BmdefeB*, *Bmatta*1, *Bmenbo*2 和 *Bmlebo*3)以及 6 种热激蛋白基因(*Bmhsp*90, *Bmhsp*70, *Bmhsp*40, *Bmhsp*19.9, *Bmhsp*21.4 和 *Bmhsp*25.4)在家蚕 5 龄幼虫中肠组织中的表达变化;利用 MEGA 5.0 软件对家蚕所有热激蛋白进行系统进化分析。【结果】与未进行热激处理相比,短时 42℃ 热激能够明显提高感染 BmNPV 的家蚕 5 龄幼虫的存活率。实时荧光定量 RT-PCR 结果表明,与未热激处理相比,热激处理后感染 BmNPV 的家蚕 5 龄幼虫中肠组织中 *Bmglve*2 和 *Bmhsp*25.4 的表达量显著上升。另外,系统进化分析显示,小分子热激蛋白 BmHSP25.4 在进化上特殊,单独与大分子热激蛋白(BmHSP90, BmHSP70 和 BmHSP40)聚为一类。【结论】短时热激能够提高家蚕对 BmNPV 的抗性,热激蛋白基因 *Bmhsp*25.4 和抗菌肽基因 *Bmglve*2 可能在家蚕热激响应的抗病毒免疫中发挥关联功能。

关键词: 家蚕; 热激; BmNPV; 抗菌肽; 热激蛋白; mRNA 表达水平

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)05-0505-08

Changes in the resistance to nucleopolyhedrovirus and the expression levels of the related antimicrobial peptide and heat shock protein genes in *Bombyx mori* exposed to short-time heat shock

TANG Fen-Fen[1,2], ZHENG Ya-Qiang[1], BAI Xing-Rong[2,*], CHEN Bin[1,*] (1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, Yunnan 661101, China)

Abstract:【Aim】This study aims to investigate the effect of short-time heat shock on the resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to nucleopolyhedrovirus, so as to provide references for further study on the antiviral immune mechanism of the silkworm in response to heat shock.【Methods】The 5th instar larvae of *B. mori* were exposed to 42℃ for 15 min, and then fed with *B. mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) (5.4×10^6 PIBs/individual). All the tested larvae were reared as usual. The transcription levels of seven major antimicrobial genes (*BmcecD*, *Bmmor*, *Bmglve*2, *BmdefeB*, *Bmatta*1, *Bmenbo*2 and *Bmlebo*3) and six heat shock protein genes (*Bmhsp*90, *Bmhsp*70, *Bmhsp*40, *Bmhsp*19.9, *Bmhsp*21.4 and *Bmhsp*25.4) in the midgut of the 5th instar larvae after heat-shock treatment were analyzed by quantitative real-time PCR. The amino acid sequences of all BmHSPs were also phylogenetically analyzed

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260583)

作者简介: 唐芬芬, 女, 1985 年 2 月生, 云南耿马人, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向为家蚕病理与分子生物学, E-mail: tfflove1985@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: chbins@163.com; bxrong3@163.com

收稿日期 Received: 2017-01-02; 接受日期 Accepted: 2017-03-31

using MEGA 5.0. 【Results】Short-time heat shock significantly increased the survival rate of the BmNPV-infected 5th instar larvae of *B. mori*, as compared with the non-heat shock group. Quantitative real-time PCR results showed that the expression levels of *Bmglve*2 and *Bmhsp*25.4 were significantly up-regulated in the midgut of the BmNPV-infected 5th instar larvae of *B. mori* exposed to heat shock in comparison with the non-heat shock groups. The phylogenetic analysis showed that BmHSP25.4 was special in evolution, and individually classified into the same cluster with large HSPs (BmHSP90, BmHSP70 and BmHSP40).【Conclusion】Short-time heat shock before BmNPV feeding can enhance the resistance of *B. mori* to BmNPV. *Bmhsp*25.4 and *Bmglve*2 may relatively function in the immunity induction of *B. mori* against BmNPV through heat shock response.

Key words: *Bombyx mori*; heat shock; BmNPV; antimicrobial peptide; heat shock protein; mRNA expression level

昆虫不具有类似哺乳动物的 B 细胞和 T 淋巴系统,体液中也没有免疫球蛋白及补体,但昆虫在与微生物长期相互作用的共同进化中,产生了抵御各种微生物侵染的快速、多样、有效的先天免疫系统,包括局部免疫反应和系统免疫反应,如上皮组织抗菌肽和活性氧的产生、血细胞对外源微生物的吞噬和包被、脂肪体产生多种抗菌肽(antimicrobial peptides)等(Hoffmann and Reichhart, 2002; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Buchon *et al*., 2009),其中很多机制和高等动物相类似(Brennan and Anderson, 2004)。

关于昆虫的先天性免疫,一直认为无法建立免疫记忆。但越来越多的证据表明,有些昆虫遭受微生物侵染引发免疫后,当再次遇到侵染时,抵抗力会提高。这种现象在许多昆虫中都有报道,如果蝇 *Drosophila melanogaster*(Pham *et al*., 2007),大蜡螟 *Galleria mellonella*(Bergin *et al*., 2006),冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*(Heard *et al*., 2005; Rodrigues *et al*., 2010)等。这种免疫增强的现象称为免疫致敏(priming or trained immunity)(Netea *et al*., 2011; Quintin *et al*., 2014)。另外,环境条件如饮食、温度等也会诱发类似的现象,影响免疫反应。研究表明,与其他物理胁迫下,幼虫通过提高抗菌肽基因的表达量而增强对微生物的抵抗力(Wojda and Jakubowicz, 2007; Mowlds *et al*., 2008)。同时,研究还表明,昆虫在面临非生物胁迫(温度骤升、紫外照射、化学药品等)和生物胁迫(病毒、细菌、真菌等)时,会采取表达热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)的策略来应对这些胁迫(Hickman and Hildebrand, 2004; Lu and Wan, 2011; Datkhile *et al*., 2011; Tang *et al*., 2012),但有的昆虫是以损伤生殖力为代价的(Huang *et al*., 2007)。

家蚕 *Bombyx mori* 是一种重要的经济昆虫,同时也是鳞翅目的模式昆虫。家蚕的饲育适温为20~30℃,不同品种对高温的耐受性是有差异的,不同发育时期的家蚕对高温的耐受性也不同,5 龄幼虫的耐受性最高。如印度的一种多化性品种的 5 龄幼虫在 42℃下处理 1 h 无死亡现象,但在 46℃下热激 1 h 死亡率达到 100%(Vasudha *et al*., 2006)。家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)是家蚕最重要的病原之一,对蚕业生产危害极大。BmNPV 侵染会引起家蚕的抗病毒免疫反应,如家蚕脂酶(lipase)、家蚕丝氨酸蛋白酶(serine protease)等抗病毒物质及一些抗菌肽的表达(Ponnuvel *et al*., 2003; Nakazawa *et al*., 2004; Zhou *et al*., 2013)。利用热激研究家蚕品种的耐受性较为常见(Manjunatha *et al*., 2010),而关于热激是否会影响家蚕的免疫作用目前还没有相关报道。本研究采用自然喂食家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的方式,初步研究短时热激后对家蚕病毒免疫能力的影响以及家蚕对病毒抗性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕品种为皓月×箐松,常温桑树 *Morus alba* 叶育,选用蚕体健康、大小一致的 5 龄第 1 天幼虫用于实验;家蚕核型多角体病毒(BmNPV)采集于云南保山蚕区,为本实验室扩繁保存。

1.2 病毒纯化

将保存的病毒用家蚕 5 龄幼虫扩繁,收集典型发病的家蚕血液,采用蔗糖梯度(30% -40% -60%)离心的方法纯化病毒,转速为4 000 r/min,水平离心 30 min。收集病毒多角体,用灭菌水溶解,离心(8 000 r/min 离心 10 min)数次,弃上清,去除蔗糖。最后用适量灭菌水溶解,血球计数板计数病毒

多角体的浓度为 5.4×10^8 PIBs/mL，保存于 4℃ 备用。

1.3　主要试剂与仪器

总 RNA 抽提试剂 Trizol Reagents 购于美国 Invitrogen，PrimeScript II™ 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司，荧光定量试剂盒为罗氏（Roch）FastStart Universal SYBR Green Master（ROX）。

主要仪器设备有 Sigma 水平冷冻离心机、美国 BIO-RAD 高速冷冻离心机、德国 Eppendorf 公司核酸蛋白检测仪、美国 ABI StepOnePlus Real-time PCR System 等。

1.4　试虫感染病毒处理

实验设 2 个处理。处理 1：取发育良好的家蚕 5 龄第 1 天幼虫，进行短暂热激处理（42℃，15 min）后喂食病毒。每头家蚕单独喂食病毒 BmNPV，用移液枪将 BmNPV 多角体（polyhedral inclusion bodies，PIBs）悬液（5.4×10^8 PIBs/mL）添加到家蚕食叶的叶片部位，自然吸食，直至吃干净。喂食剂量为 10 μL，即喂食病毒多角体的量为 5.4×10^6 PIBs/头。处理 2：无热激处理，直接喂食病毒，喂食方法与剂量同处理 1。同时设喂食无菌水的对照组，每个处理重复 3 次，每个重复 20 头家蚕，其后用高培养皿单头正常饲养，统计发病死亡虫数。

以上述同样方法处理家蚕 5 龄幼虫，分别于喂食病毒 BmNPV 3，6，12 和 24 h 后解剖家蚕，取各处理组的中肠组织。每 3 头家蚕的中肠组织为一个样品，共 3 个重复。保存于 −80℃ 冰箱中备用。

1.5　家蚕抗菌肽及热激蛋白基因 mRNA 表达量的检测

1.5.1　靶基因确定：目前，家蚕抗菌肽有 7 个大家族，分别为 Cecropin，Moricin，Gloverin，Attacin，Enbocin，Lebocin 和 Defensin，它们的基因均以基因家族形式存在。根据其主功能基因产物的广谱抗菌活性和强的诱导表达活性（Yang *et al*., 2011），分别选择 *BmcecD*，*Bmglve*2，*Bmatta*1，*Bmlebo*3，*Bmmor*，*Bmenbo*2 和 *BmdefeB* 作为候选基因，这些基因的 NCBI 登录号分别是：NM_001043368.1，NM_001044218.2，NM_001043541.1，NM_001126260.1，NM_001043364.2，NM_001098374.1 和 NM_001135205.1。

到目前为止，已鉴定并公布序列的家蚕热激蛋白包括大分子热激蛋白和小分子热激蛋白共有 20 个，本研究选择具有代表性的 6 个热激蛋白基因 *Bmhsp*90，*Bmhsp*70，*Bmhsp*40，*Bmhsp*19.9，*Bmhsp*21.4 和 *Bmhsp*25.4 作为候选基因，GenBank 登录号分别是 AB060275，DQ311189，AB206400，AB195970，AB195972 和 EU401668。

1.5.2　引物设计：根据荧光定量引物设计的要求，利用软件 Primer Premier 5.0 设计靶基因特异引物（表 1）。以家蚕 *actin*3（GenBank 登录号：X04507）作为内参基因，所有引物序列由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.5.3　总 RNA 提取与检测：将 1.4 节处理后的中肠组织置于研钵中，加入液氮快速研磨后，按照50～100 mg /mL Trizol Reagent 向研钵中加入试剂。然后按照 Trizol Reagent 试剂说明书提取实验组与对照组家蚕中肠组织的总 RNA。获得的 RNA 置于 −80℃ 备用，测定 OD 值，检测提取组织 RNA 的浓度和质量后用于反转录实验获得 cDNA 模板。

1.5.4　相关基因实时荧光定量检测与统计方法：实时荧光定量 RT-PCR 反应在 ABI StepOnePlus 上进行。参照 Real-time PCR Master Mix 试剂盒说明书，20 μL PCR 扩增体系：SYBR Green Master（Rox）10 μL，PCR Forward Primer（10 μmol/L）0.6 μL，PCR Reverse Primer（10 μmol/L）0.6 μL，DNA 模板 2.0 μL，ddH_2O 6.8 μL。PCR 程序：95℃ 预变性 1 min；95℃ 变性 15 s，60℃ 退火 31 s，72℃ 延伸 45 s，40 个循环。每个重复样品测 3 次。基因相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 表示（Livak and Schmittgen，2011）。

1.6　系统进化分析

从家蚕基因组数据库（http://silkworm.genomics.org.cn/）及 NCBI 数据库（http://www.ncbi.nim.nih.gov/）查询并下载 20 种家蚕热激蛋白的蛋白序列，利用 MEGA5.0 软件进行多序列比对后，采用邻接法构建进化树，并用 Bootstrap 1 000 次重复验证进化树的可能性。

2　结果

2.1　短时热激提高了家蚕在 BmNPV 侵染后的存活率

家蚕 5 龄幼虫热激处理（42℃，15 min）后，将喂食 BmNPV（5.4×10^6 PIBs/头）的处理组与未经热激直接喂食 BmNPV 和喂食无菌水的对照组的累计存活率进行比较。结果表明（图 1），家蚕喂食 BmNPV 后 108 h 开始死亡，120－132 h 是家蚕死亡的高峰期。在喂食病毒后 132 h，未经过热激处理的

表 1 实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in the experiment

基因名称 Gene name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	预期产物大小(bp) Predicted product size
BmcecD	F：CTATCCTTCGTCTTCGCTCT R：ATGTTCCTGCCCATTTTTTC	104
*Bmglve*2	F：AAGTTTACGGACCTTCTGATTACG R：AGTGCCAAAGACCTTGCCTC	119
*Bmatta*1	F：CAGTGAACTCGGATGGAACC R：CCGTGCCCGTTTATATTGTC	160
*Bmlebo*3	F：AGTTCTGGTGCTGTTCTTTGC R：CACTGTACGTGTTATCGGGC	128
Bmmor	F：CGCTCCAGCAAAAATACCTA R：TACCGACTGCCTTTCCTACA	156
*Bmenbo*2	F：CTTGTTCGTTGTTGTTTTC R：TGCGCCTACCGTCGCCACC	130
BmdefeB	F：GATTGGATTATCCAGGCGG R：AACAGTATTGTTCTGATGAGAGATAG	110
*Bmhsp*90	F：GTCATAATTGTGCCAGAATACTTAC R：TGATACATTCAGAGTTCACCTTTAG	120
*Bmhsp*70	F：ACTGTGCTTCCCAGATACGC R：AACGACTGCGGCAAACC	131
*Bmhsp*40	F：CCTTCCAGAAAGAAGGTGATCG R：ATGTCACTGCCTTCTCGCTTG	106
*Bmhsp*19.9	F：TTGGCTCCAGCATCAAAAGTG R：TCTTCTCCTCGTGTTTGCCTTC	132
*Bmhsp*21.4	F：CGGGACAGCGAAGACTTAA R：ATGCCAAACACGAGGAGAA	112
*Bmhsp*25.4	F：TGTCGTTGAAGTTCCCCAGCAT R：CTGCACCATCAGCACTCCATTTT	134
*Bmactin*3	F：CGGGAAATCGTTCGTGAT R：ACGAGGGTTGGAAGAGGG	181

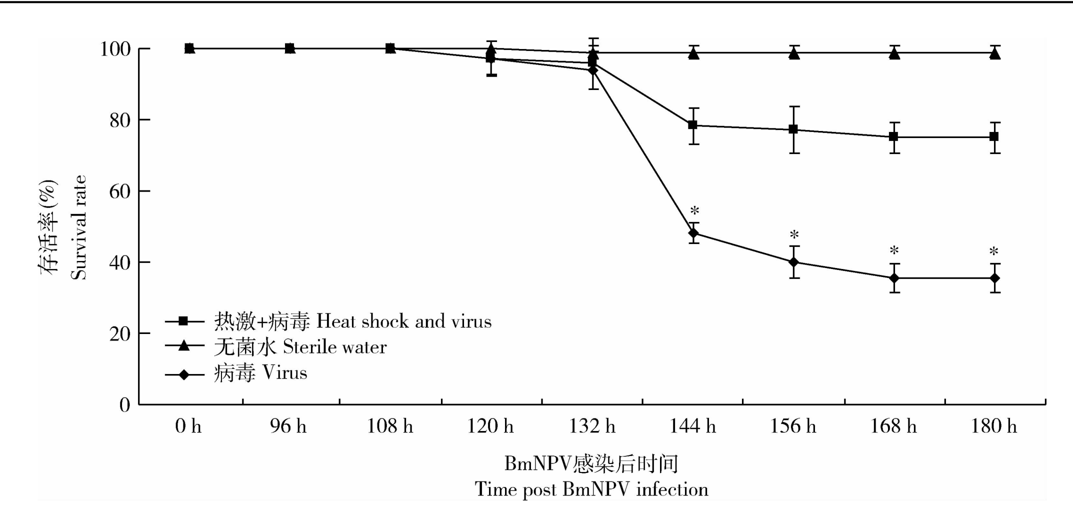


图 1 短时热激(42℃, 15 min)后喂食 BmNPV 对家蚕 5 龄幼虫存活率的影响

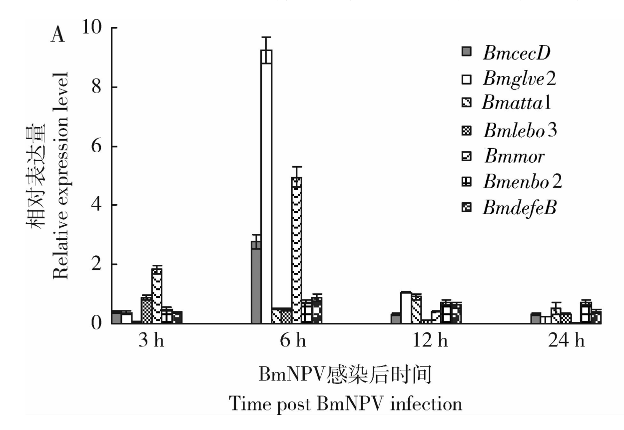
Fig. 1 Effects of BmNPV feeding after short-time heat shock (42℃, 15 min) on the survival rates of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

热激 + 病毒 Heat shock and virus：热激处理(42℃, 15 min)后喂食 BmNPV Feeding with BmNPV after short-time heat shock (42℃, 15 min)；无菌水 Sterile water：喂食无菌水为对照组 Feeding with sterile water as the control；病毒 Virus：直接喂食 BmNPV Feeding with BmNPV directly. BmNPV 喂食剂量为 5.4×10^6 PIBs/头。以下各图同。BmNPV is given at the dose of 5.4×10^6 PIBs/individual. The same for the following figures. 图中数据为平均值 ± 标准差；星号表示经热激后喂食病毒的处理组与未热激直接喂食病毒组之间存活率存在极显著差异(*t*-检验, $P < 0.01$)。Data in the figure are mean ± *SD*. Asterisk indicates extremely significant differences in the survival rates between the heat shock and non-heat shock groups before infected with BmNPV (*t*-test, $P < 0.01$).

对照组存活率突然就降到了 48%，而经过热激处理组的存活率为 78%。两者在 168 h 的存活率分别为 35% 和 75%。经热激处理后喂食病毒与未热激直接喂食相比，存活率提高了 2.1 倍。该结果表明，喂食 BmNPV 前短时热激增强了家蚕对 BmNPV 病原的抗性。

2.2 短时热激对 7 类家蚕抗菌肽主基因表达的影响

家蚕抗菌肽作为主要免疫因子之一，在抗病毒中可能发挥着重要的作用。本研究利用实时荧光定量 RT-PCR 检测了短时热激后家蚕 5 龄幼虫中肠中 7 类抗菌肽主基因 mRNA 转录水平。在直接喂食 BmNPV 后 6 h 时，所检测的 7 类抗菌肽主基因中有 4 个基因达到诱导表达高峰，分别是 *BmcecD*，*Bmglve*2，*Bmmor* 和 *BmdefeB*（图 2：A）。其中 *Bmglve*2 最为显著，呈现出先上升后下降的趋势。热激后喂食病毒处理组的抗菌肽主基因的表达情况与未热激直接喂食处理组有所差异，但 *Bmglve*2 的诱导表达水平也是最高的，其表达量高峰被延至 12 h（图 2：B），是无菌水处理对照组的近 80 倍，是直接喂食病毒处理组的 8.47 倍。



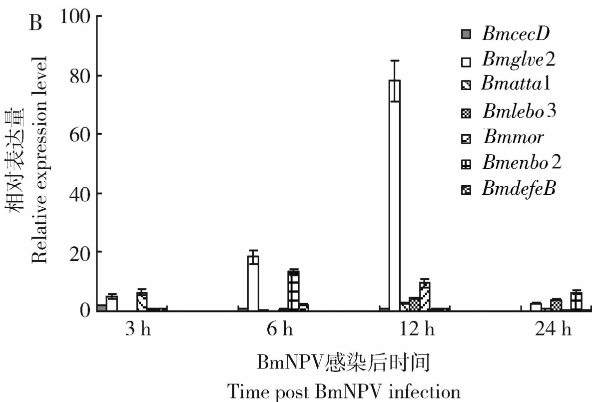


图 2 qRT-PCR 分析家蚕 5 龄幼虫中肠中 7 种抗菌肽主基因的相对转录水平

Fig. 2 Relative transcription levels of seven major antimicrobial genes in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* analyzed by qRT-PCR

A：未经热激直接喂食 BmNPV No heat shock and feeding BmNPV directly；B：喂食 BmNPV 前进行热激（42℃，15 min）Exposed to heat shock（42℃，15 min）before feeding BmNPV. 图中数据为平均值 ± 标准差。Data in the figure are mean ± *SD*.

2.3 短时热激对家蚕热激蛋白基因表达的影响

家蚕经热激后，其体内表达的热激蛋白可能影响家蚕免疫。本研究用实时荧光定量 RT-PCR 检测了家蚕部分热激蛋白基因热激后在 5 龄幼虫中肠中的转录水平。结果表明，喂食 BmNPV 会诱导所检测的 6 种热激蛋白中部分热激蛋白基因表达上调（图 3：A），在喂食 BmNPV 后 3 h，*Bmhsp*70，*Bmhsp*19.9 和 *Bmhsp*25.4 基因表达上调；24 h 时，仅 *Bmhsp*90 基因的转录水平呈明显上调趋势。其中 *Bmhsp*25.4 基因的诱导表达量在整个过程较高，在处理组 6 h 达到高峰，随后降低。

在喂食 BmNPV 前进行短时热激处理组所检测的热激蛋白在中肠中的表达趋势与直接喂食病毒的处理组是一致的（图 3：B），如 *Bmhsp*90 基因在两种处理中均在处理 24 h 表达量升高，但在喂食病毒前是否进行热激对其表达量无影响，都是对照组的 12 倍左右；*Bmhsp*25.4 基因的表达量逐渐上升后又下降，在 6 h 达到高峰；热激后喂食病毒处理组的 *Bmhsp*25.4 基因的表达量大幅度上升，是直接喂食病毒的 19 倍，存在极显著差异（$P < 0.01$）（图 3：C）。推测 *Bmhsp*25.4 在中肠应对外界刺激与抵抗病毒中具有重要的作用。

2.4 家蚕热激蛋白的系统进化分析

应用 MEGA5.0 软件构建了家蚕热激蛋白的系统发育树，结果如图 4 所示，进化树明显划分为 2 个分支，16 种小分子热激蛋白的进化亲缘关系较近，聚为一类。而 BmHSP25.4 作为小分析热激蛋白在进化上比较特殊，没有和其他小分子热激蛋白聚为一类，而是与大分子热激蛋白（BmHSP90，BmHSP70 和 BmHSP40）在进化发育上较为接近，推测它在进化上有特殊的意义。

3 讨论

本研究发现，在对家蚕喂食 BmNPV 前进行短时热激（42℃，15 min），能够提高家蚕对 BmNPV 的

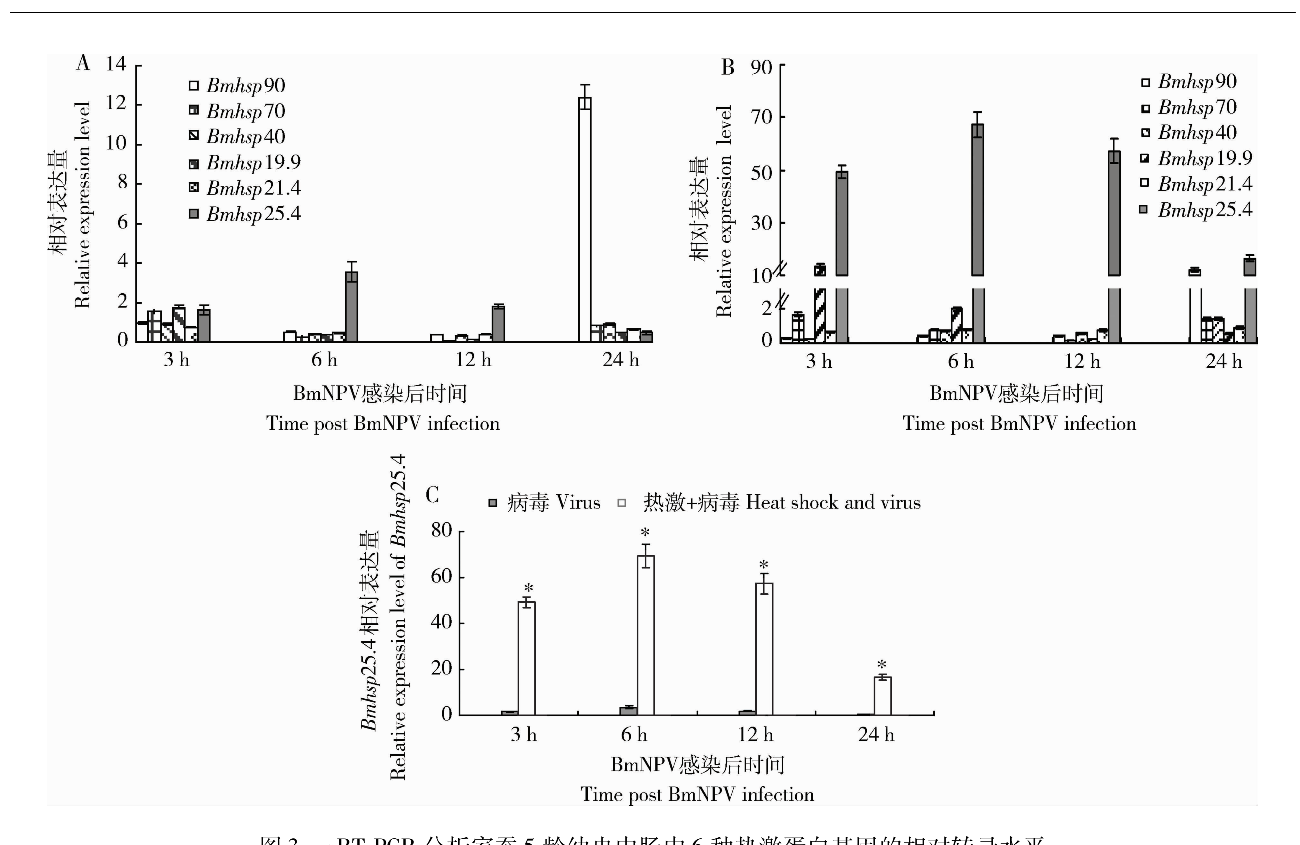


图 3 qRT-PCR 分析家蚕 5 龄幼虫中肠中 6 种热激蛋白基因的相对转录水平

Fig. 3 Relative transcription levels of six heat shock protein genes in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* analyzed by qRT-PCR

A：未经热激直接喂食 BmNPV No heat shock and feeding BmNPV directly；B：喂食 BmNPV 前进行热激（42℃，15 min）Exposed to heat shock（42℃，15 min）before feeding BmNPV；C：直接喂食 BmNPV 与热激（42℃，15 min）后喂食 BmNPV 两种情况下 *Bmhsp*25.4 的表达情况 The expression levels of *Bmhsp*25.4 in heat shock（42℃，15 min）and non-heat shock groups before feeding BmNPV. 图中数据为平均值 ± 标准差；柱上星号表示经热激后喂食病毒的处理组与未热激直接喂食病毒处理组之间 *Bmhsp*25.4 基因相对表达量存在极显著差异（*t*-检验，$P < 0.01$）。Data in the figure are mean ± *SD*. Asterisk indicates extremely significant difference in the expression levels of *Bmhsp*25.4 between heat shock and non-heat shock groups infected with BmNPV（*t*-test，$P < 0.01$）.

抗性，由此表明热激能够增强家蚕对病毒的免疫作用，因此在生物测定病毒对家蚕的致病作用研究中应选择合适的温度条件，以降低温度对防治效果的影响，从而准确判断不同病毒或不同毒株对家蚕的侵染致病力。同样，在对家蚕病毒病的防治中也应考虑环境温度对家蚕抗病毒免疫的影响，考虑到温度对防治效果的影响。

昆虫在面临温度骤升和微生物胁迫时，会采取提高抗菌肽及热激蛋白基因表达量的策略来应对这些胁迫（Wojda and Jakubowicz，2007；Tang *et al*.，2012）。本研究发现，家蚕在喂食 BmNPV 病毒后，部分抗菌肽基因的表达明显上调，尤其 *Bmglve*2 表达上调明显，该结果与 Bao 等（2010）研究报道的 BmNPV 侵染后大量诱导家蚕脂肪体与血淋巴中 Gloverin 抗菌肽家族基因在 6 h 表达的结果相似。同时，*Bmglve*2 作为 Gloverin 家族的主基因，对微生物诱导的表达活性和抗菌活性最强（Yang *et al*.，2011）。另外，在大蜡螟中热激后使许多抗菌肽基因的表达上调，从而增强了大蜡螟对苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 侵染的抵抗力（Wojda and Jakubowicz，2007）。由此推测 Gloverin 抗菌肽家族在家蚕抗病毒作用中可能发挥重要作用，这也是短时热激增强家蚕对 BmNPV 免疫的重要原因。

家蚕中已有许多编码 HSPs 的基因被克隆和鉴定。目前，鉴定的热激蛋白共有 20 个，大分子热激蛋白有 HSP90，HSP70 和 HSP40，小分子热激蛋白有 HSP19.9，HSP20.8，HSP20.1，HSP21.4，HSP23.7 和 HSP25.4 等 17 种（Sakano *et al*.，2006；Li *et al*.，2009；Sosalegowda *et al*.，2010；Sheng *et al*.，2010；罗素娟等，2010）。关于家蚕 HSPs 的研究主要集中在高温胁迫与耐热性方面，而关于热休克蛋白在生理生化及分子进程的特殊功能作用缺乏

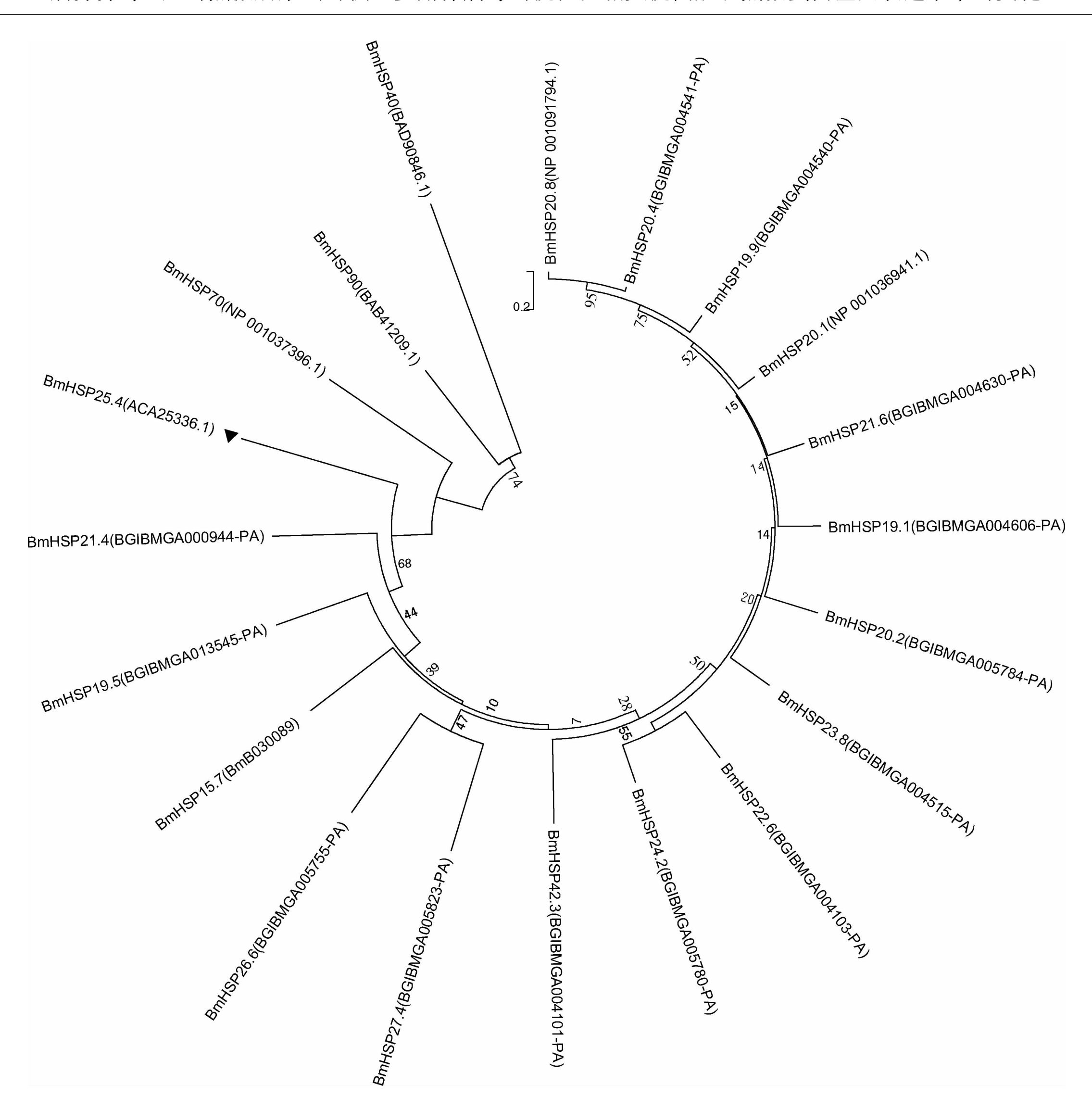


图 4　家蚕热激蛋白的系统发育进化树（邻接法）

Fig. 4　Phylogenetic tree of Hsps from *Bombyx mori*（neighbor-joining method）

标尺示遗传距离；各分支上的数字为自引导值（1 000 次重复）。The scale bar represents genetic distance. The bootstrap values were obtained from 1 000 replicates.

认识。据报道，热激蛋白作为免疫相关蛋白，与哺乳动物的防御机制有关（Hickman-Miller and Hildebrand，2004），其在昆虫的免疫反应中的作用也备受关注。如大蜡螟 HSP90 蛋白（Wojda and Jakubowicz，2007）、家蝇 *Musca domestica* HSP70（Tang *et al*.，2012）、柞蚕 *Antheraea pernyi* 小热激蛋白 sHSP21.4（Zhang *et al*.，2015）。本研究发现家蚕 6 种热激蛋白基因在喂食 BmNPV 后家蚕中肠组织中的表达不同，其中 *Bmhsp*70，*Bmhsp*19.9，*Bmhsp*90 和 *Bmhsp*25.4 上调表达明显，而对这些蛋白在家蚕免疫中的功能将是进一步深入研究的内容。此外，本研究还发现家蚕经过适时热激后喂食 BmNPV，小分子热激蛋白基因 *Bmhsp*25.4 的表达量大幅度增加。由此推测，BmHSP25.4 在应对高温胁迫和抗病毒免疫中很可能发挥着重要作用，但对这种免疫作用及其机制还需要进一步深入研究。

参考文献（References）

Bao YY，Lv ZY，Liu ZB，Xue J，Xu YP，Zhang CX，2010. Comparative analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus responsive genes in fat body and haemocyte of *B. mori* resistant and susceptible strains. *Insect Mol. Biol*.，19(3)：347－358.

Bergin D，Murphy L，Keenan J，Clynes M，Kavanagh K，2006. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect*.，8(8)：2105－2112.

Brennan CA, Anderson KV, 2004. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.*, 22: 457-483.

Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B, 2009. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe*, 5(2): 200-211.

Datkhile KD, Mukhopadhyaya R, Dongre TK, Nath BB, 2011. Hsp70 expression in *Chironomus ramosus* exposed to gamma radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 87(2): 213-221.

Heard NA, Holmes CC, Stephens DA, Hand DJ, Dimopoulos G, 2005. Bayesian coclustering of *Anopheles* gene expression time series: study of immune defense response to multiple experimental challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(47): 16939-16944.

Hickman-Miller HD, Hildebrand WH, 2004. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends Immunol.*, 25(8): 427-433.

Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 3(2): 121-126.

Huang LH, Chen B, Kang L, 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *J. Insect Physiol.*, 53: 1199-1205.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25(25): 697-743.

Li ZW, Li X, Yu QY, Xiang ZH, Kishino H, Zhang Z, 2009. The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes. *BMC Evol. Biol.*, 9: 215.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Lu ZC, Wan FH, 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *J. Exp. Biol.*, 214(Pt5): 764-769.

Luo SJ, Yang HP, Li YN, Zhang ZF, Zhang YZ, 2010. Cloning and analysis of small heat-shock gene *Hsp*23.7 from *Bombyx mori*. *Chin. Bull. Entomol.*, 47(3): 467-471. [罗素娟, 杨慧鹏, 李轶女, 张志芳, 张耀洲, 2010. 家蚕小热激蛋白家族成员 *Hsp*23.7 基因的克隆与分析. 昆虫知识, 47(3): 467-471]

Maniunatha HB, Rajesh RK, Aparna HS, 2010. Silkworm thermal biology: a review of heat shock response, heat shock proteins and heat acclimation in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sci.*, 10(1): 204.

Mowlds P, Bsrron A, Kavanagh K, 2008. Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes Infect.*, 10(6): 628-634.

Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M, 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virilogy*, 321(1): 154-162.

Netea MG, Quintin J, van der Meer JW, 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, 9(5): 355-363.

Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS, 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog.*, 3(3): e26.

Ponnuvel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M, 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.*, 77(19): 10725-10729.

Quintin J, Cheng SC, van der Meer JW, Netea MG, 2014. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.*, 29: 1-7.

Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C, 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*, 329(5997): 1353-1355.

Sakano D, Li B, Xia QY, Yamamoto K, Fujii H, Aso Y, 2006. Gene encoding small heat shock proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(10): 2443-2450.

Sheng Q, Xia J, Nie Z, Zhang Y, 2010. Cloning, expression, and cell localization of a novel small heat shock protein gene: *BmHSP*25.4. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 1297-1305.

Sosalegowda AH, Kundapur RR, Boregowda MH, 2010. Molecular characterization of heat shock proteins 90 (HSP83?) and 70 in tropical strains of *Bombyx mori*. *Proteomics*, 10(15): 2734-2745.

Tang T, Wu C, Li J, Ren G, Huang D, Liu F, 2012. Stress-induced HSP70 from *Musca domestica* plays a functionally significant role in the immune system. *J. Insect Physiol.*, 58(9): 1226-1234.

Vasudha BC, Aparna HS, Manjunatha HB, 2006. Impact of heat shock on heat shock proteins expression, biological and commercial traits of *Bombyx mori*. *Insect Sci.*, 13(4): 243-250.

Wojda I, Jakubowicz T, 2007. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.*, 53(11): 1134-1144.

Yang W, Cheng T, Ye M, Deng X, Yi H, Huang Y, Tan X, Han D, Wang B, Xiang Z, Chao Y, Xia Q, 2011. Functional divergence among silkworm antimicrobial peptide paralogs by the activities of recombinant proteins and the induced expression profiles. *PLoS ONE*, 6(3): e18109.

Zhang C, Dai L, Wang L, Qian C, Wei G, Li J, Zhu B, Liu C, 2015. Inhibitors of eicosanoid biosynthesis influencing the transcripts level of sHSP21.4 gene induced by pathogen infections in *Antheraea pernyi*. *PLoS ONE*, 10(4): e0121296.

Zhou Y, Gao L, Shi HF, Xia HC, Gao L, Lian CQ, Chen L, Yao Q, Chen KP, Liu XY, 2013. Microarray analysis of gene expression profile in resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals resistance-related genes to nucleopolyhedrovirus. *Genomics*, 101(4): 256-262.

(责任编辑: 马丽萍)